Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Günter Goslar

Vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen zum Verhalten der Ca^{++}-aktivierten ATPase und der Mg^{++}-aktivierten ATPase im Hodengewebe der Ratte und des Frosches

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Richard Bartels

1984

UNIV.
LAVAL
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0059

Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Hans Günter Goslar

Vergleichende enzymhistochemische Untersuchungen zum Verhalten der Ca^{++}-aktivierten ATPase und der Mg^{++}-aktivierten ATPase im Hodengewebe der Ratte und des Frosches

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Richard Bartels

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan	Referent
der Medizinischen Fakultät	gez.:
der Universität	Prof.Dr.med.H.G. Goslar
	Korreferent
gez.:	gez.:
Prof.Dr.med. A. Hopf	Prof.Dr.rer.nat.,Dr.med. P. Pfitzer

MEINEN ELTERN GEWIDMET

Seite

1. Einleitung 1

2. Material und Methode 5

2.1 Entnahme und Einfrieren der Testesgewebe .. 5
2.2 Schnittherstellung 5
2.3 Enzymhistochemische Reaktionen für ATPasen 5
2.3.1 Enzymhistochemische Methode für Ca^{++}-ATPase nach Padykula und Herman (1955,a,b.) 6
2.3.2 Enzymhistochemische Methode für Ca^{++}-ATPase nach Meijer (197o) 6
2.3.3 Enzymhistochemische Methode für Mg^{++}-ATPase nach Meijer und Vloedman (198o) 7
2.3.4 Gegenfärbung der Kryostatschnitte 7
2.3.5 Auswertung der Enzymaktivität 8

3. Ergebnisse 9

3.1 Enzymaktivität des Rattenhodens 9
3.1.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden (Methode nach Padykula und Herman, 1955, a,b.) 9
3.1.2 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden (Methode nach Meijer, 197o) 9
3.1.3 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Rattenhoden (Methode nach Meijer und Vloedman, 198o) .. 1o
3.1.4 Abhängigkeit der ATPasen-Aktivität von den einzelnen Spermatogenese-Stadien der Ratte 1o
3.2 Enzymaktivität des Froschhodens 13
3.2.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden (Methode nach Padykula und Herman, 1955, a,b.) 13
3.2.2 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden (Methode nach Meijer, 197o) 14
3.2.3 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Froschhoden (Methode nach Meijer und Vloedman, 198o) .. 14

4. Diskussion 29

4.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden .. 29
4.2 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Rattenhoden .. 33
4.3 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden .. 34
4.4 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Froschhoden .. 36
4.5 Vergleich der ATPase -Aktivität zwischen Ratten- und Froschhoden 37

5. Zusammenfassung 4o

6. Literatur 42

1. Einleitung

Adenosintriphosphatasen (ATPasen) gehören zur Enzymgruppe der Hydrolasen und katalysieren folgende Reaktionen:
$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + Orthophosphat$.
Physiologisch führen die ATPasen den Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) herbei, d.h. sie spalten energiereiche Phosphatverbindungen unter Freisetzung von Energie ab, ferner dienen sie bei der ATP-Synthese als Kupplungsfaktor. (Pearse, 1968; Firth, 1978; Lojda et al. 1979).

Biochemische Untersuchungen haben fünf verschiedene ATPasen Typen aufgeschlüsselt, die sowohl Differenzen in der Reaktionskinetik als auch spezifische Unterschiede gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren aufweisen (Freiman und Kaplan, 196o; Lojda et al., 1979). Der enzymhistochemische Nachweis gelang jedoch bisher nur für die drei folgenden ATPasen:

1. Ca^{++}-aktivierte Myosin-ATPase (E.C.3.6.1.3.), (= Ca^{++}-ATPase)
2. Mg^{++}-aktivierte mitochondriale-ATPase (E.C.3.6.1.4.), (= Mg^{++}-ATPase)
3. Na^{+}/K^{+}-aktivierte Zellmembran-ATPase (keine E.C.-Nr.). (= Na^{+}/K^{+}-ATPase)

Zu 1. Myosin-ATPase kommt in den Myosinfilamenten einem Bestandteil des A-Bandes der quergestreiften Muskulatur vor. Dieses Enzym wird benötigt, um den Kontraktionszustand der Muskulatur rückgängig zu machen. (Padykula und Herman, 1955, a,b; Meijer, 197o; Schneider, 1971).
Zu 2. Mitochondriale-ATPase, die durch Mg^{++}-Ionen aktiviert wird, spielt eine essentielle Rolle bei der Energieproduktion, da sie der oxydativen Phosphorylierung als Kupplungsfaktor dient und so bei der ATP-Produktion mitwirkt. (Meijer und Vloedman, 198o).

Zu 3. Zellmembran-ATPase wird durch Na^+/Ka^+-Ionen aktiviert und beteiligt sich an der Aufrechterhaltung der Natrium/Kalium-Pumpe (Ernst, 1972; Lojda et al.,1979). Im Gegensatz zu den biochemischen Befunden (Freiman und Kaplan, 196o) wird ihr enzymhistochemisches Verhalten in der Literatur sehr widersprüchlich dargestellt (Ernst, 1972; Lojda et al., 1979).

Es gibt bisher nur wenige Untersuchungen zur enzymhistochemischen Lokalisation der ATPasen im Hodengewebe (U.a. Baust et al., 1967; Böck et al., 1972; Kormano und Hovatta, 1972; Keyhani und Storey, 1973; Breitenecker et al., 1974; Passia et al.,1978; Hilscher et al., 1979; Jülich et al., 1982).

Baust et al. (1967) untersuchten Lokalisation und Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Hoden von Ratten, Meerschweinchen und Mäusen nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b). Bei Ratten und Meerschweinchen ergaben sich übereinstimmende Befunde: die größte ATPasen-Aktivität fand sich in der Lamina propria der Tubuli(boundary tissue), eine schwache Aktivität trat im Keimepithel der Tubuli auf. Bei der Maus dagegen zeigte sich die größte ATPasen-Intensität nur in den Bindegewebsanteilen des Interstitiums, während die Leydigzellen allenfalls schwach aktiv waren. Passia et al. (1978) berichten über das stadienabhängige Verhalten der Ca^{++}-ATPase bei den einzelnen Spermatogenese-Stadien der Wistarratte. So zeichnet sich das Stadium XII durch eine beginnende Farbstoffanhäufung um die Mittelstücke der elongierten Spermatiden aus; die Farbstoffbeladung nahm dann im Bereich der elongierten Spermatiden deutlich zu und die fast ausgereiften Spermatiden zeigten im Stadium VII eine starke Enzymaktivität (Methode nach Padykula und Hermann, 1955,a,b.). Hilscher et al.(1979) fanden bei der gleichen Spezies eine mäßige Aktivität in den apikalen Cytoplasmaanteilen der Sertolizellen und in den Kopf- und Mittelstücken der

elongierten Spermatiden, eine starke Aktivität in der Lamina propria und im Interstitium. Weiterhin konnten sie zeigen, daß die ATPase-Aktivität von den verschiedenen Stadien der Spermatogenese abhängig ist. Böck et al. (1972) untersuchten elektronenmikroskopisch die Lamina propria menschlicher Hodenkanälchen und wiesen hier Myofibrillen nach, die sie durch Inkubation einer ATP-haltigen Lösung zur Kontraktilität gebracht hatten. (s. auch Murakami, 1966). Kormano und Hovatta(1972) fanden ebenfalls Myoidzellen mit Filamenten in der Lamina propria des Rattenhodens; sie stellten weiter fest, daß die ATPase -Aktivität in besagten Myoidzellen mit den verschiedenen Phasen der postnatalen Entwicklung der Testes eindeutig korreliert werden kann. Die umfangreichen morphologischen und biochemischen Studien von Keyhani und Storey (1973) zeigten, daß die Mitochondrien in den Spermienschwänzen der Kaninchen in der Lage sind, energiereiche Substanzen zu speichern; diese sind von essentieller Bedeutung für die Spermienmotilität (Bucher, 1973; Bloom und Fawcett, 1975). Breitenecker et al.(1974) befaßten sich mit dem V e r g l e i c h der enzymhistochemischen ATPasen-Aktivität des Ratten- und Menschenhodens nach der modifizierten Methode von Wachstein und Meisel (1957). Bei der Ratte fanden sie die größte Aktivität in den interstitiellen Blutgefäßen, in der Lamina propria sowie im Keimepithel, während beim Menschenhoden die Aktivität zwar auch in den interstitiellen Blutgefäßen und in der Lamina propria nachweisbar war, im Keimepithel jedoch fehlte. Jülich et al. (1982) berichteten über die Aktivität der Ca^{++}-ATPase (Methode nach Padykula und Herman, 1955, a,b.) im Testis von Rana temporaria. Hier zeigte sich die größte Aktivität in den Follikelzellen der Zystenwand, den reifen Sertolizellen und in der Lamina propria. Weiterhin konnten Jülich et al. (1982) nachweisen, daß die Intensität der ATPasen-Reaktion mit den jahreszeitlich unterschiedlichen Aktivitäts-

phasen im Verlauf des spermatogenetischen Zyklus von Rana temporaria korreliert werden kann.

Während die bisher aufgeführten Arbeiten sich mit der Ca^{++}-ATPase befaßten, liegen über den enzymhistochemischen Nachweis der Mg^{++}-ATPase im Testis keine Literaturhinweise vor.
Deshalb stellten wir uns die folgenden Aufgaben:

1. Vorkommen und Verhalten der Mg^{++}-ATPase im Ratten- und im Froschhoden zu untersuchen,
2. die Mg^{++}-ATPase -Aktivität mit der Ca^{++}-ATPase - Aktivität in Topik und Intensität zu vergleichen,
3. die Unterschiede in der Lokalisation und Intensität der Enzyme zwischen Ratten- und Froschhoden aufzuzeigen. Der Frosch Rana temporaria wurde als Versuchstier der Amphibiengruppe gewählt, weil er einen jahreszeitlichen Fortpflanzungszyklus aufweist. (Witschi, 1924; van Oordt, 1956; Brökelmann, 1964; Jülich et al., 1982).

2. Material und Methode

2.1, Entnahme und Einfrieren der Testisgewebe

Sieben männliche Wistarratten mit einem mittleren Körpergewicht von 2oo g wurden durch Äthernarkose und anschließender Dekapitation getötet. Weiterhin wurden sieben männliche Frösche der Art Rana temporaria (mittleres Körpergewicht von 4o g) im Monat September 1982 durch Dekapitation und anschließender Zerstörung des Rückenmarkes getötet. Die Testes der beiden Tierarten wurden sofort entnommen. Für die enzymhistochemischen Reaktionen wurden beide Hoden der Ratte sowie beide Hoden des Frosches jeweils auf einem Block in flüssigem Stickstoff bei -19o°C eingefroren. Der Vorgang von der Tötung des Tieres bis zum Einfrieren dauerte jeweils 2 bis 3 Minuten. Die schockgefrorenen Hoden wurden bis zur Aufarbeitung in den nächsten Tagen in Dewargefäßen, welche mit CO_2-Schnee gefüllt waren, in einer Tiefkühltruhe bei -7o°C gelagert.

2.2. Schnittherstellung

Für den enzymhistochemischen Nachweis der ATPasen wurden von den tiefgefrorenen Testes, in einem Kryostaten (Fa. Dittes, Heidelberg) bei -18°C, 8 bis 1o µm dicke Schnitte angefertigt.

2.3. Enzymhistochemische Reaktionen für ATPasen

Folgende zwei Enzyme wurden an den Kryostatschnitten des Hodens bei Ratte und Frosch nachgewiesen:

1. Calciumaktivierte Myosin-ATPase (Ca^{++}-ATPase, EC 3.6.1.3.)nach folgenden Methoden:
   a) Padykula und Herman (1955, a,b; Lojda et al.,1979).
   b) Meijer (197o)

2. Magnesiumaktivierte Mitochondrium-ATPase (Mg^{++}-ATPase, EC 3.6.1.4. nach der Methode von Meijer und Vloedman (198o).

2.3.1. Enzymhistochemische Methode für Ca^{++}-ATPase nach Padykula und Herman (1955, a,b.)

Hierzu wurden die Kryostatschnitte fünf Minuten lang in einer 4%igen Calcium-Formol-Lösung vorfixiert und in Aqua dest. gespült.
Das Inkubationsmedium bestand aus:
o,1 M. Natrium-Barbiturat
o,18 M. $CaCl_2$-Lösung
Aqua dest.
Als Substrat diente das Dinatriumsalz der Adenosin-5-Triphosphorsäure (Serva,Heidelberg). Um die mitreagierenden alkalischen Phosphatasen zu hemmen, wurde dem Inkubationsmedium o,o62% 2,3 Dimercapto-1-Propanol (BAL) zugesetzt. Anschließend wurde das Inkubationsmedium auf einen pH von 9,4 eingestellt und die Kryostatschnitte 2o Minuten bei+37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal in einer 1%igen $CaCl_2$-Lösung gewaschen, drei Minuten in eine 2%ige $CoCl_2$-Lösung überführt und wiederum in Aqua dest. gespült. Nach einer kurzen Behandlung mit einer o,5%igen Ammonium-Sulfid-Lösung und erneuter Spülung in Aqua dest. wurden sie anschließend mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

2.3.2 Enzymhistochemische Methode für Ca^{++}-ATPase nach Meijer (197o)

Die Kryostatschnitte wurden fünf Minuten lang in einer 4%igen Formaldehyd-Macrodex-Lösung vorfixiert und in Aqua dest. gespült.
Das Inkubationsmedium bestand aus:
o,2 M Tris-/Maleinsäure-Puffer pH 7,2
1,5%ige Bleinitratlösung

1%ige Calciumchloridlösung
Aqua dest.
Als Substrat diente das Dinatriumsalz der Adenosin-5-Triphosphorsäure (Serva,Heidelberg). Das Inkubationsmedium wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt und die Schnitte 2o Min. bei+2o° C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kryostatschnitte zunächst in Leitungswasser und anschließend in Aqua dest. gespült, danach kurz in eine o,5%ige Ammonium-Sulfid-Lösung eingetaucht, wieder in Aqua dest. gespült und dann mit Glycerin- Gelatine eingedeckt.

2.3.3 Enzymhistochemische Methode für Mg^{++}-ATPase nach Meijer und Vloedman (198o)

Die Kryostatschnitte wurden 5 Min. lang in einer 4%igen Formaldehyd-Macrodex-Lösung vorfixiert und in Aqua dest. gespült.
Das Inkubationsmedium bestand aus:
o,2 M Tris-/Maleinsäure-Puffer pH 7,2
2%ige Bleinitratlösung
1,2%ige Magnesium-Sulfat-Lösung
Aqua dest.
Als Substrat diente das Dinatriumsalz der Adenosin-5-Triphosphorsäure (Serva,Heidelberg).
Das Inkubationsmedium wurde auf einen pH von 7,2 eingestellt und die Schnitte 15 Min. lang bei+37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zunächst in Leitungswasser und anschließend in Aqua dest. gespült, danach kurz in eine o,5%ige Ammonium-Sulfid-Lösung gebracht, wieder in Aqua dest. gespült und dann mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

2.3.4 Gegenfärbung der Kryostatschnitte

Nach der Durchführung der enzymhistochemischen Reaktionen wurde an jedem dritten Schnitt eine Gegenfärbung mit

Haemalaun durchgeführt, um eine genauere Charakterisierung der einzelnen Geschlechtstypen zu erreichen.

2.3.5 Auswertung der Enzymaktivität

Die Lokalisation und die Intensität der Enzymaktivität in den Kryostatschnitten wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Orthoplan, LEITZ, Wetzlar) untersucht. Die Intensität der Enzymaktivität wurde semiquantitativ in fünf verschiedene Aktivitätsgrade eingeteilt:

\- = keine Aktivität
\+ = schwache Aktivität
\++ = mäßige Aktivität
\+++ = starke Aktivität
\++++ = sehr starke Aktivität

Außerdem wurden Mikroaufnahmen der Kryostatschnitte mit repräsentativen Enzymaktivitäten angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1. Enzymaktivität des Rattenhodens

3.1.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden
(Methode nach Padykula und Herman, 1955,a,b.)

Die elongierten Spermatiden und Spermien zeigen eine schwache bis mäßige Enzymaktivität. Diese Aktivität ist in den Mittelstücken und in den Schwänzen der Spermien lokalisiert. (s.Abb.3). Die Spermatocyten im adluminalen Compartment weisen - abhängig von den Stadien der Spermatogenese - eine nur sehr schwache Aktivität auf, das Sertolizellcytoplasma zeigt im basalen Compartment kaum eine bzw. eine sehr schwache Enzymaktivität (s.Abb.3). In der Lamina propria tritt eine mäßig bis starke Aktivität in Form eines Randsaumes auf (s.Abb.1,2). Die Leydig- und Bindegewebszellen im interstitiellen Raum zeigen ebenfalls eine mäßige Aktivität (s.Abb.2,3). Eine starke Aktivität wird in der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße festgestellt (s.Abb.3 und Tabelle 1).

3.1.2 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden
(Methode nach Meijer, 197o).

Die elongierten Spermatiden und Spermien zeigen eine mäßige bis starke Enzymaktivität. Auch hier ist die Enzymaktivität in den Mittelstücken und Schwänzen der Spermien lokalisiert (s.Abb.5). Die Spermatocyten und Sertolizellen weisen im adluminalen Compartment - abhängig von den Stadien der Spermatogenese - keine oder eine nur schwache Enzymaktivität auf. (s.Abb.6). Im basalen Compartment zeigen die Spermatogonien eine schwache Enzymaktivität (s. Abb.6). Die Sertolizellen, in deren apikalem Bereich die Köpfe der Spermien eingetaucht sind, zeigen im Cytoplasma eine mäßige Aktivität. In der Lamina propria tritt eine starke bis sehr starke

Aktivität in Form eines Randsaumes auf (s.Abb. 4,6). Die Leydigzellen und Bindegewebszellen im interstiellen Raum zeigen ebenfalls eine starke Aktivität (s.Abb.4, 6,7). Eine starke Anfärbung wird in der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße festgestellt (s. Abb.8 und Tabelle 1).

3.1.3 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Rattenhoden (Methode nach Meijer und Vloedman, 198o).

Das Verhalten der Mg^{++}-ATPase in den Geschlechtszellen, besonders in den Spermien und Spermatiden, weist eine deutliche Korrelation mit den verschiedenen Stadien der Spermatogenese (s.Abb.9,1o,11) auf. Die elongierten Spermatiden und Spermien zeigen eine mäßige bis sehr starke Enzymaktivität (s.Abb.9,1o). Die Geschlechtszellen im adluminalen Compartment enthalten nur eine schwache bis mäßige Aktivität (s.Abb.9,1o,11). Auch im basalen Compartment lassen die Spermatogonien und pachytänen Spermatocyten eine schwache bis mäßige Aktivität erkennen. In den Sertolizellen, in deren apikalem Bereich die Köpfe der Spermien eingetaucht sind, findet sich eine mäßige Aktivität im Cytoplasma (s.Abb.11,12). In der Lamina propria tritt eine diffuse starke bis sehr starke Aktivität auf (s. Abb. 1o,11,12). Die Leydig- und Bindegewebszellen im interstitiellen Raum sind mäßig bis stark tingiert (s.Abb.1o,11). In der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße wird eine starke Aktivität festgestellt. (s.Tabelle 1).

3.1.4 Abhängigkeit der ATPasen-Aktivität von den einzelnen Spermatogenese-Stadien der Ratte [1)]

Die Stadien der Spermatogenese im Rattentestis werden

---

1) s.nächste Seite.

[1] Leblond und Clermont (1952, a,b.) beschrieben den Spermatogenesezyklus der Ratte in vierzehn Stadien. (Stadium I bis Stadium XIV) Die Spermiogenese, d.h. die Entwicklung der Spermatiden bis zur Bildung der reifen Spermien, teilten die Autoren in neunzehn Stufen (1 - 19) ein; diese neunzehn Stufen lassen sich in vier Phasen zusammenfassen: Golgiphase, "Cap-Phase", Acrosomalphase und die Reifungsphase. Folgende Übersicht aus der Arbeit von Leblond und Clermont (1952, a, Tabelle 2) gibt die Zuordnung der neunzehn Stufen der Spermiogenese zu den vierzehn Stadien des Spermatogenesezyklus wieder:

Spermatogenesestadien	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Spermiogenesestufen	Golgiphase			"Cap-Phase"				Acrosomalphase						
erste Schicht der Spermatiden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11	12	13	14
zweite Schicht der Spermatiden	Reifungsphase 15	16	16	17	17	18	19							

Dies bedeutet, daß während der ersten sieben Stadien (I - VII) der Spermatogenese zwei Generationen von Spermatiden gleichzeitig vorkommen. Eine Generation der alten Spermatiden (Stufe 15 - 19) und eine Generation von jungen Spermatiden (Stufe 1 - 7). Die Freisetzung der Spermien erfolgt im Stadium VIII.

nach den von Leblond und Clermont (1952, a,b.) angegebenen Definitionen bestimmt.
Die Ca^{++}-ATPase-Aktivität (Methode nach Padykula und Herman, 1955, a,b.) kommt in den Spermien hauptsächlich während des Stadiums VII vor, d.h. wenn die Spermien ausgereift sind und kurz vor der Freisetzung stehen (Abb.3). Während der übrigen Stadien wird entweder keine oder aber eine nur sehr schwache Enzymaktivität in den Spermatiden und Spermien beobachtet (Abb.2).

Die Ca^{++}-ATPase-Aktivität (Methode nach Meijer 197o) differenziert die Stadien deutlicher und zeigt folgendes stadienabhängiges Verhalten:
Im Stadium I ist jetzt eine schwache und in den Stadien II bis III eine mäßige Enzymaktivität in den unreifen Spermien sichtbar (Abb.6,7). Diese Enzymaktivität nimmt in den darauffolgenden Stadien der Spermatogenese kontinuierlich zu (Abb.8), so daß am Ende der Spermienreifung im Stadium VII eine maximale Aktivität beobachtet wird (Abb.5,6,7). Nach der Freisetzung der reifen Spermien kommt in der nachfolgenden Generation der jungen runden Spermatiden in den Stadien IX bis X eine schwache bis mäßige Enzymaktivität vor (Abb.3,8). Diese Enzymaktivität bleibt weiterhin während der acrosomalen Phase bis zum Stadium II erhalten.

Die Mg^{++}-ATPase-Aktivität (Methode nach Meijer und Vloedman, 198o) zeigt folgendes stadienabhängiges Verhalten:
Während der Reifungsphase der elongierten Spermatiden ist eine kontinuierliche Zunahme der Enzymaktivität in diesen Geschlechtszellen sichtbar (s.das Enzymverhalten in den Abb. 12, Stadium IV; Abb.1o, Stadium V; Abb.11, Stadium VI der Spermatogenese). Der apikale Bereich der Sertolizellen während des Stadiums V der Spermatogenese

- die elongierten Spermatiden sind jetzt in das Cytoplasma der Sertolizelle tief eingetaucht - weist eine mäßige Enzymaktivität auf (Abb.1o). Eine maximale Anfärbung wird in den ausgereiften Spermien während der Stadien VII und VIII, kurz vor der Freisetzung, beobachtet (Abb.9,11). Nach der Freisetzung ist in den jungen Spermatiden, die sich nunmehr im Elongationsprozeß befinden, eine schwache bis mäßige Aktivität sichtbar. Dieser Aktivitätsgrad bleibt weitgehend bis zum Stadium II der Spermatogenese erhalten. Anschließend ist wiederum eine kontinuierliche Zunahme der Enzymaktivität zu beobachten.

3.2. Enzymaktivität des Froschhodens

Die untersuchten Testes der Frösche befanden sich im Übergang von der Reifungsphase zur Ruhephase der Fortpflanzung.

Reifungsphase: Die Reifungsphase findet in den Monaten Juli und August statt. Während dieser Zeit entwickeln sich die Spermatogonien weiter zu Spermatocyten. Es findet eine meiotische Reifungsteilung statt. Ende Juli wird das Bild der Hodenkanälchen weitgehend von den Spermatocyten geprägt. Im Monat August schreitet die Spermatogenese über die Bildung von Spermatiden zu reifen Spermien (Ende August) fort. Gleichzeitig transformieren sich die Follikelzellen der Zystenwand zu reifen Sertolizellen, die der Tubuluswand anhaften und jeweils ein Spermienbündel versorgen.

Ruhephase: Diese verläuft von Mitte September bis Mitte Februar und ist charakterisiert durch Bündel von reifen Spermien, deren Kopfenden vom Cytoplasma der Sertolizellen umgeben sind. Es findet keine Spermatogenese statt.

3.2.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden

(Methode nach Padykula und Herman,1955,a,b.)

Im Anfang der Ruhephase zeigen die Spermien eine schwache

Aktivität, die in den Schwänzen lokalisiert ist. Ebenso weisen die Spermatiden eine schwache Aktivität auf. Spermatogonien und Spermatocyten sind in diesem Zyklusabschnitt im Testis nicht vorhanden. Die Sertolizellen lassen im Cytoplasma eine schwache Aktivität erkennen (s.Abb.13). In der Lamina propria tritt eine mäßige Aktivität auf. Auch die Leydig- und Bindegewebszellen enthalten eine mäßige Enzymaktivität. In der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße wird eine mäßige Aktivität festgestellt (s.Tabelle 2).

3.2.2 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden
(Methode nach Meijer, 197o)

Die Spermien weisen in der gleichen Phase eine schwache Aktivität auf, die in den Spermienschwänzen lokalisiert ist. Auch in den Spermatiden ist die Aktivität schwach. Das Gleiche gilt für die Sertolizellen im apikalen Bereich des Cytoplasmas (s.Abb.14,15). In der Lamina propria tritt eine mäßige, in den Leydig- und Bindegewebszellen eine schwache bis mäßige Enzymaktivität auf, während in den Wänden der interstitiellen Blutgefäße eine starke Aktivität festgestellt wird (s.Tabelle 2).

3.2.3 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Froschhoden
(Methode nach Meijer und Vloedman, 198o)

Eine maximale Enzymaktivität in besagter Phase weisen die Spermien auf; sie ist in den Spermienschwänzen lokalisiert (s.Abb.16,17). Die Spermatiden zeigen keine bis eine schwache, die Sertolizellen eine schwache bis mäßige Aktivität (s.Abb.16,17). In der Lamina propria wird eine mäßig bis starke Aktivität (s.Abb.16,18), in den Leydig- und Bindegewebszellen eine mäßige Aktivität festgestellt. Die Wände der interstitiellen Blutgefäße sind schwach angefärbt (s.Tabelle 2).

Tabelle 1

Intensität der ATPasen-Reaktionen im Testis der Wistar-Ratte.

- = keine Aktivität
+ = schwache Aktivität
++ = mäßige Aktivität
+++ = starke Aktivität
++++ = sehr starke Aktivität

	Ca^{++}-ATPase[1] pH 9,4	Ca^{++}-ATPase[2] pH 7,2	Mg^{++}-ATPase[3] pH 7,2
Luminales Compartment (Spermien)	+ bis ++ [4]	++ bis +++ [4]	++ bis ++++ [4]
Adluminales Compartment (Spermatiden, Spermatocyten)	- bis (+) [4]	- bis + [4]	+ [4]
Basales Compartment (Spermatogonien pachytäne Spermatocyten)	- [4]	+ [4]	+ bis ++ [4]
Lamina propria	++ bis +++	+++ bis ++++	+++ bis ++++
Leydigzellen und Bindegewebe	++	+++	++ bis +++
Interstitielle Blutgefäße	+++	++++	++++

1. Nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b)
2. Nach der Methode von Meijer (197o)
3. Nach der Methode von Meijer und Vloedman (198o)
4. Die Intensität ist von den Stadien der Spermatogenese abhängig.

Tabelle 2

Intensität der ATPasen-Reaktionen im Testis des Frosches (Rana temporaria).

- = keine Aktivität
+ = schwache Aktivität
++ = mäßige Aktivität
+++ = starke Aktivität
++++ = sehr starke Aktivität

	Ca^{++}-ATPase[1] pH 9,4	Ca^{++}-ATPase[2] pH 7,2	Mg^{++}-ATPase[3] pH 7,2
Spermien	+	+	++++
Spermatiden	+	+	- bis +
Sertolizellen	+	+	+ bis ++
Lamina propria	++	++	++ bis +++
Leydigzellen und Bindegewebe	++	+ bis ++	++
Interstitielle Blutgefäße	++	+++	+

1. Nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b)
2. Nach der Methode von Meijer (197o)
3. Nach der Methode von Meijer und Vloedman (198o)

Abb. 1 - 18:

8 - 1o µm Kryostatschnitte des Testis von Ratte und Frosch.

Abb.1
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Padykula und Herman, 1955,a,b.). Diese Übersicht der Tubuli seminiferi zeigt eine unterschiedliche schwache Aktivität in den Spermien, eine mäßig bis starke Aktivität in der Lamina propria und eine starke Aktivität in den interstitiellen Blutgefäßen. x 13o.

Abb.2
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Padykula und Herman, 1955,a,b.). Gegenfärbung mit Haemalaun. Eine mäßige Aktivität der Lamina propria und eine mäßig bis starke Aktivität in den Blutgefäßen des Interstitiums. Das mittlere Hodenkanälchen zeigt das Stadium XII der Spermatogenese. x 13o.

Abb.3
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Padykula und Herman, 1955,a,b.). Gegenfärbung mit Haemalaun. Dieser Ausschnitt eines Tubulus seminiferus zeigt eine schwache Aktivität in den Spermien (Stadium VII der Spermatogenese), eine mäßig bis starke Aktivität in der Lamina propria und eine mäßig bis starke Aktivität in den Blutgefäßen. x 33o.

Abb.1

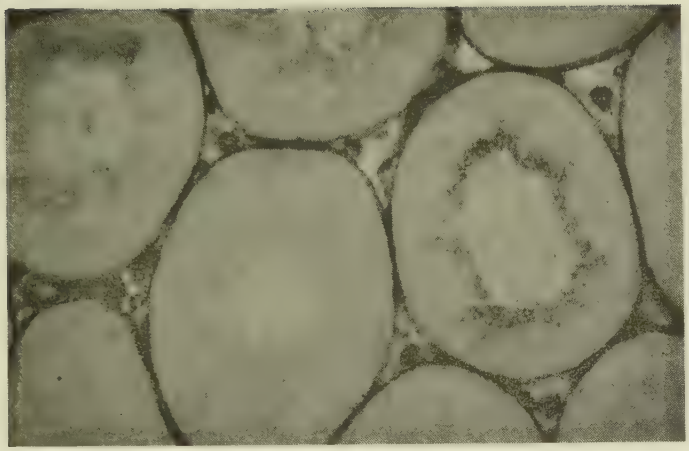


Abb.2

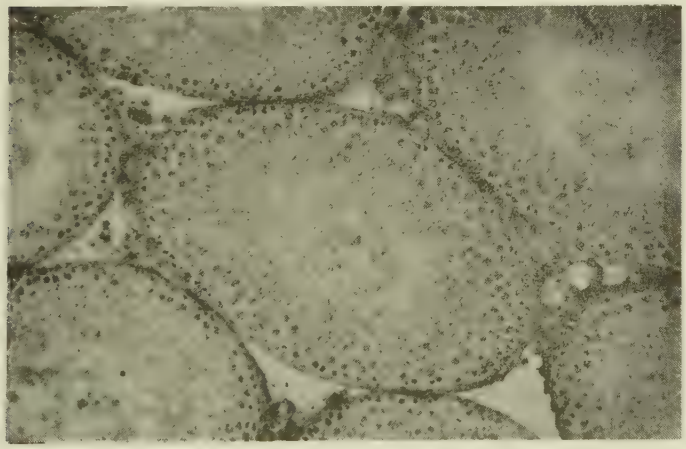


Abb.3

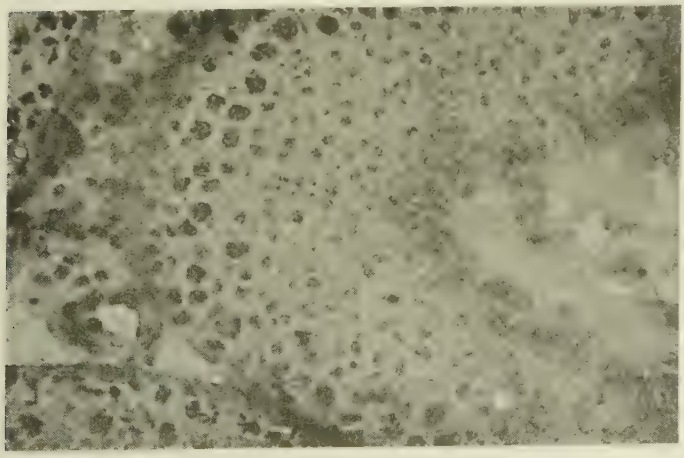


Abb.4
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Übersicht der Tubuli seminiferi. Die Intensität der Enzymaktivität in den Spermien ist abhängig von den Stadien der Spermatogenese. Eine starke Aktivität in der Lamina propria und eine sehr starke Aktivität in der Wand der Blutgefäße.
x 13o.

Abb.5
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Dieser Tubulus seminiferus zeigt eine starke Aktivität in den Spermien (Stadium VII der Spermatogenese), eine schwache Aktivität im adluminalen Compartment und eine sehr schwache Aktivität in der Lamina propria.
x 33o.

Abb. 6
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Dieses Bild zeigt einen Ausschnitt von 4 benachbarten Tubuli seminiferi mit dem dazugehörigen interstitiellen Raum. Diese 4 Tubuli seminiferi befinden sich in verschiedenen Stadien der Spermatogenese und die Spermien zeigen eine unterschiedlich starke Enzymaktivität. (Schwach bis sehr stark; die Hodenkanälchen zeigen links oben: Stadium I; links unten: Stadium II bis III; rechts unten: Stadium VII). Auch das adluminale und basale Compartment zeigt eine schwache Aktivität. Die Lamina propria und die Blutgefäße weisen eine starke Aktivität auf.
x 33o.

Abb. 4

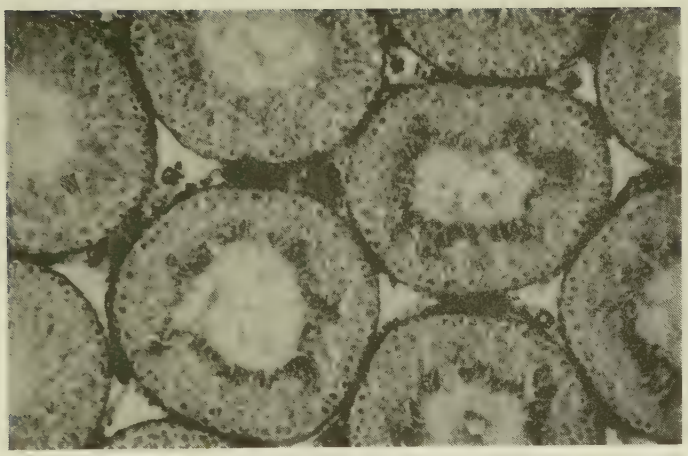


Abb. 5

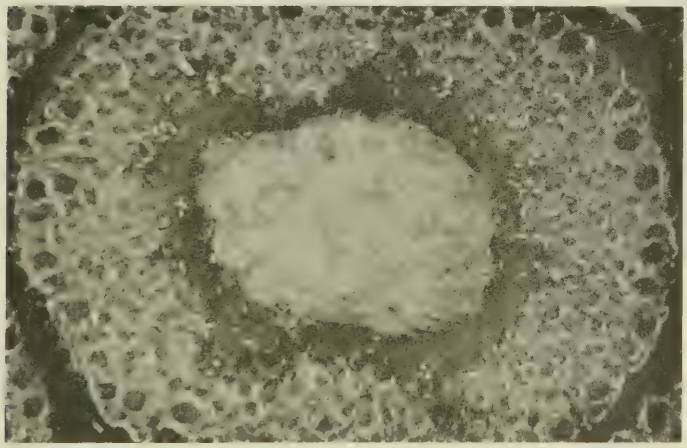


Abb. 6

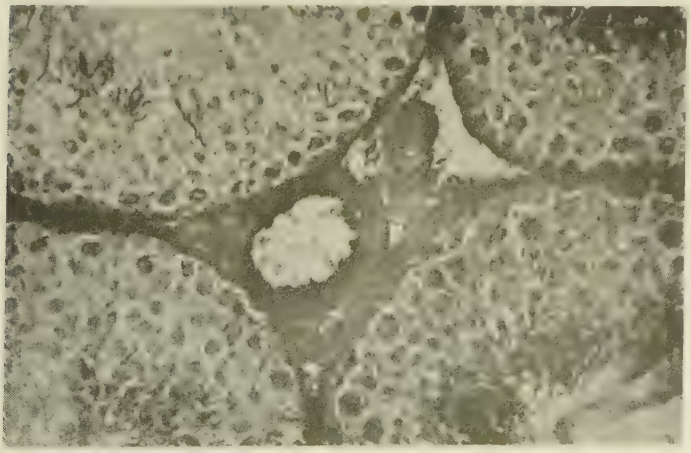


Abb.7
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt aus 2 benachbarten Tubuli seminiferi. Die Spermien des rechten Tubulus seminiferus (Stadium VII der Spermatogenese) zeigen eine starke Aktivität, während die des linken Tubulus seminiferus (Stadium I der Spermatogenese) eine schwache Aktivität zeigen. - Ein Hinweis auf die Stadienabhängigkeit der Enzymaktivität. Die Lamina propria weist hier eine sehr starke Aktivität auf.
x 33o.

Abb.8
Ratte. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Ein Ausschnitt aus 2 benachbarten Tubuli seminiferi. Hier zeigen die Spermien des rechten Tubulus seminiferus (Stadium VI der Spermatogenese) eine mäßige, die des linken Tubulus seminiferus (Stadium IX der Spermatogenese) eine nur schwache Aktivität. Die Lamina propria weist eine sehr starke Aktivität auf. Auch die Tunica intima und Tunica adventitia der Blutgefäße im interstitiellen Raum weisen eine sehr starke Aktivität auf.
x 33o.

Abb.9
Ratte. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Dieser Tubulus seminiferus weist eine sehr starke Aktivität in den Spermien (Stadium VII der Spermatogenese), eine schwache Aktivität im Cytoplasma der Sertolizellen und eine starke Aktivität in der Lamina propria auf.
x 33o.

Abb. 7

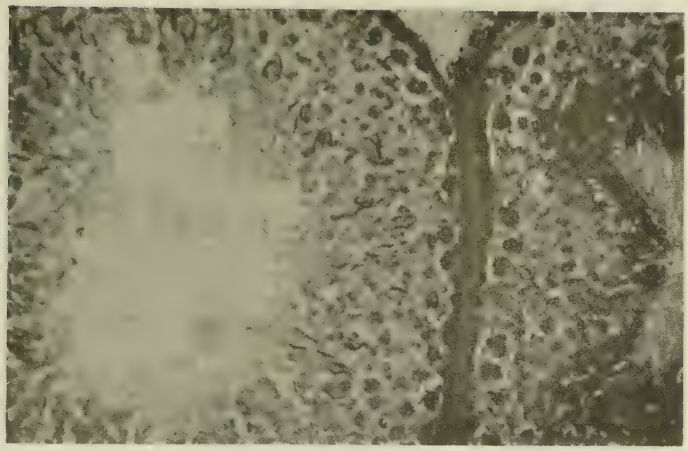


Abb. 8

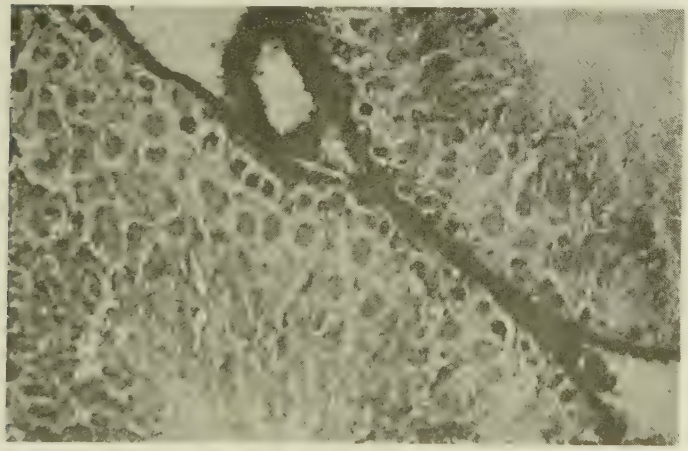


Abb. 9

Abb.1o
Ratte. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o). Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt aus einem Tubulus seminiferus. Dieser Ausschnitt zeigt eine starke Aktivität der im Reifungsprozeß befindlichen Spermien (Stadium V der Spermatogenese). In diesem Stadium, wenn die elongierten Spermatiden im Cytoplasma der Sertolizelle eingetaucht sind, ist eine schwache bis mäßige Aktivität im Cytoplasma der Sertolizelle sichtbar. Die Geschlechtszellen sind deutlich ausgespart. Die Lamina propria weist eine sehr starke Aktivität auf.
x 33o.

Abb.11
Ratte. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o). Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt zweier benachbarter Tubuli seminiferi. Abhängig von den Stadien der Spermatogenese zeigen die Spermatiden und Spermien eine unterschiedlich starke Aktivität. Im rechten Tubulus seminiferus (Stadium VI der Spermatogenese) eine mäßige, im linken Tubulus seminiferus (Stadium VII der Spermatogenese) eine starke Enzymaktivität. Weiterhin zeigt im rechten Tubulus das Cytoplasma der Sertolizelle eine schwache Aktivität. Die Lamina propria weist eine sehr starke Enzymaktivität auf.
x 33o.

Abb.12
Ratte. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o). Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt zweier benachbarter Tubuli seminiferi. Die sich in der Elongation befindlichen Spermatiden zeigen während des Stadiums XI der Spermatogenese eine schwache bis mäßige Enzymaktivität des rechten Tubulus seminiferus; die Geschlechtszellen des basalen Compartments zeigen eine deutlich mäßige Aktivität des Cytoplasmas der Spermatogonien. Im linken Tubulus seminiferus (Stadium IV der Spermatogenese) ist eine schwache bis mäßige Aktivität im adluminalen Compartment und im Cytoplasma der Sertolizelle sichtbar. Die Lamina propria weist eine starke Aktivität auf.
x 33o.

Abb.10

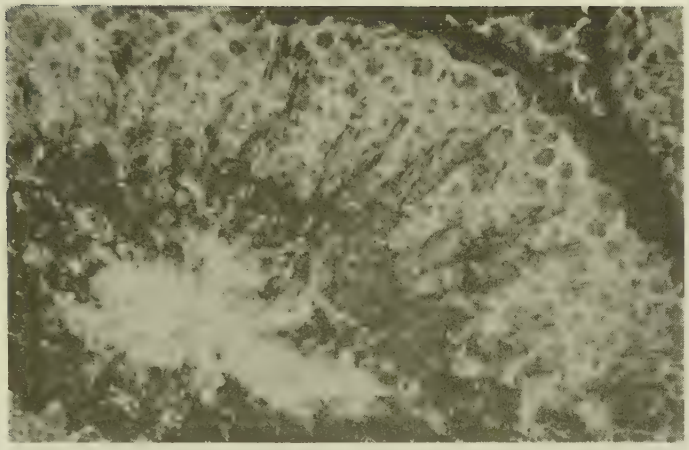


Abb.11

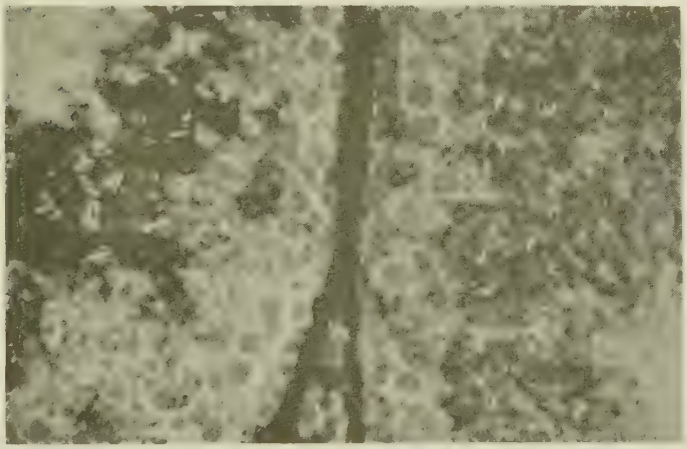


Abb.12

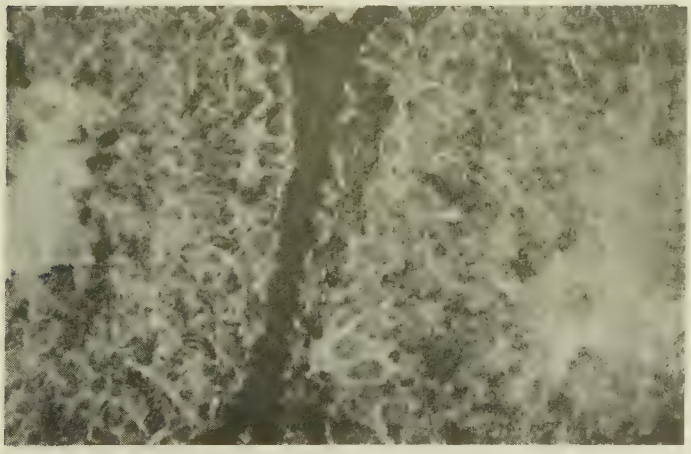


Abb.13
Frosch. Monat September. Ca^{++}-ATPase (Padykula und Herman, 1955, a,b.).
Ausschnitt aus einem Tubulus seminiferus. Die Spermienschwänze zeigen eine sehr schwache Enzymaktivität. Die Lamina propria weist eine mäßige Aktivität auf.
x 33o.

Abb.14
Frosch. Monat September. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Diese Übersicht der Tubuli seminiferi zeigt eine schwache Aktivität in den Spermienschwänzen und eine mäßige Aktivität in der Lamina propria. Eine starke Aktivität tritt in den Blutgefäßen im interstiellen Raum auf.
x 13o.

Abb.15
Frosch. Monat September. Ca^{++}-ATPase (Meijer, 197o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt aus 4 Tubuli seminiferi. Eine sehr schwache Aktivität in den Spermienschwänzen und eine mäßige Aktivität in der Lamina propria.
x 33o

Abb.13

Abb.14

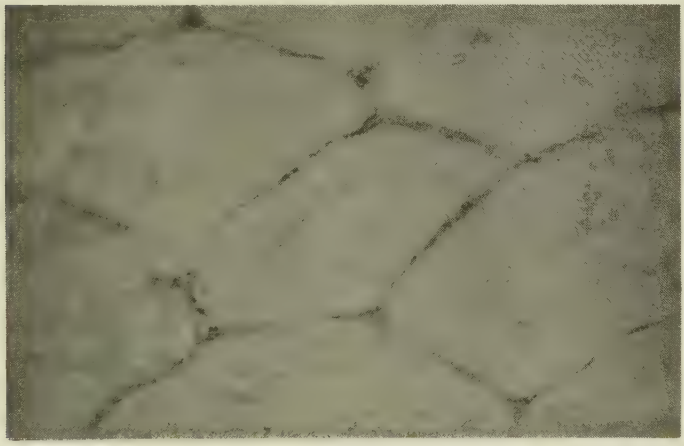


Abb.15

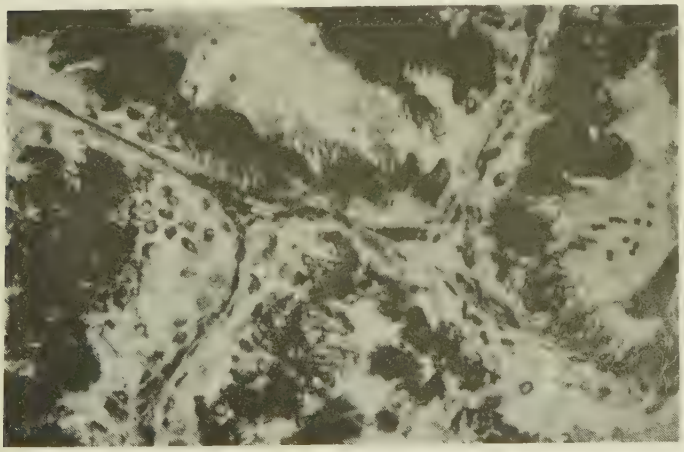


Abb.16
Frosch. Monat September. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o).
Diese Übersicht der Tubuli seminiferi weist eine sehr starke Aktivität in den Spermienbündeln, eine schwache Aktivität in den Sertolizellen und eine mäßige Aktivität in der Lamina propria auf.
x 13o.

Abb.17
Frosch. Monat September. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o).
Eine Ausschnittsvergrößerung aus der Abb. 16. Die Spermien weisen hier eine sehr starke Aktivität auf.
x 132o.

Abb.18
Frosch. Monat September. Mg^{++}-ATPase (Meijer und Vloedman, 198o).
Gegenfärbung mit Haemalaun. Ausschnitt aus 2 benachbarten Tubuli seminiferi. Die Spermien zeigen eine sehr starke Enzymaktivität, die Lamina propria eine mäßig bis starke Enzymaktivität auf.
x 33o.

Abb.16

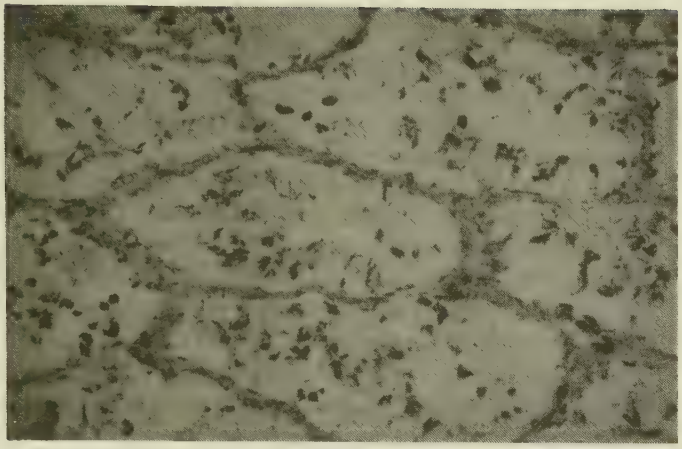


Abb.17

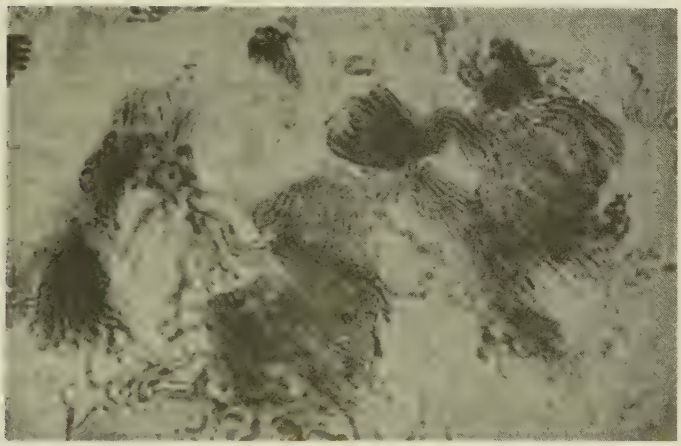
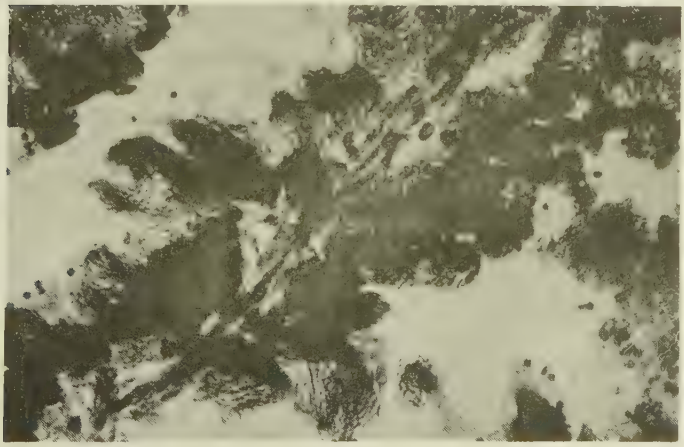


Abb.18



4. Diskussion

4.1 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden

Bereits Baust et al. (1967), die u.a. die ATPase - Aktivität im Hoden von Ratten, Meerschweinchen und Maüsen nach der Methode nach Padykula und Herman (1955,a,b.)untersuchten, beobachteten bei Ratte und Meerschweinchen übereinstimmende Befunde der ATPase -Aktivität, während bei der Maus sich leichte Unterschiede zeigten. Die größte ATPase -Aktivität fand sich bei Ratte und Meerschweinchen im Interstitium sowie in den Leydigzellen. Eine schwache Aktivität trat in den innersten Schichten des Samenepithels bei Ratte und Meerschweinchen auf. Bei der Maus dagegen fand sich eine sehr starke Aktivität in den bindegewebigen Anteilen des Interstitiums, während die Leydigzellgruppen nur schwach aktiv waren. Böck et al. (1972) demonstrierten die Kontraktilität der isolierten Fibroblasten aus der Lamina propria menschlicher Hodenkanälchen durch Eintauchen in eine ATP-haltige Lösung. Aufgrund dieser Beobachtung plädierten die Autoren für eine Zuordnung der Fibroblasten zu den Gruppen der Myofibroblasten. Kormano und Hovatta (1972) untersuchten die postnatale Entwicklung der Lamina propria bei den Ratten und demonstrierten u.a. da ATPase-Vorkommen mit der Methode von Wachstein und Meisel (1957) im Interstitium und in der Lamina propria. Die enzymhistochemischen Ergebnisse stimmten mit der Entwicklung der Myoidzellen in der Lamina propria überein. Auch Hilscher et al.(1979) konnten nach der Methode von Padykula und Herman(1955,a,b.) die Ca^{++}-ATPase im Rattenhoden nachweisen. Diese Autoren fanden eine starke Aktivität im Interstitium sowie in der Lamina propria. Eine schwache bis mäßige Aktivität wurde in den apikalen Zytoplasmaanteilen der Sertolizellen und in den Kopf- und Mittelstücken der elongierten Spermatiden festgestellt. Weiterhin zeigten sie auf, daß die ATPase-Aktivität von den verschiedenen Stadien der Spermatogenese abhängig ist.

In der hier vorliegenden Studie finden sich nach der Methode von Padykula und Herman (1955,a,b,),sowie nach der Methode von Meijer (197o) übereinstimmende Befunde mit den bisher genannten Autoren. Mit der Methode von Padykula und Hermann (1955, a,b.) wurde auch hier eine mäßige Aktivität in den Mittelstücken und Schwänzen der Spermien lokalisiert, weiterhin zeigte sich eine mäßig starke Aktivität in der Lamina propria. Eine starke Aktivität wurde in der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße festgestellt. Mit der Methode nach Meijer (197o) zeigten die elongierten Spermatiden und Spermien eine mäßig starke Enzymaktivität; diese war in den Mittelstücken und Schwänzen der Spermien lokalisiert. In der Lamina propria trat ebenfalls eine starke bis sehr starke Aktivität in Form eines Randsaumes auf, eine maximale Aktivität wurde in der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße festgestellt.

Bereits Hilscher et al. (1979) haben nachgewiesen, daß das Verhalten der Ca^{++}-ATPase im Rattentestis von den Stadien der Spermatogenese abhängig ist (s.auch Fußnote S. 11). Diese Autoren beschrieben eine schwache Enzymaktivität im apikalen Bereich der Sertolizellen während der Stadien IX bis X der Spermatogenese. Diese Enzymaktivität nahm kontinuierlich bis zum Stadium VII der Spermatogenese zu. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Befunden von Hilscher et al. (1979) überein. Auch hier wurde eine kontinuierliche Zunahme der Enzymaktivität während der Reifungsphase der elongierten Spermatiden (Stadium III bis VIII der Spermatogenese) beobachtet.

Beim Vergleich der beiden o.g. Methoden zeigt diese Studie, daß sich die Intensität der Enzymaktivität bei der Ratte unterschiedlich darstellt. Bei der Methode nach Meijer (197o) läßt sich sowohl die Lokalisation als auch

die Intensität,im Gegensatz zur Methode nach Padykula und Herman(1955,a,b.)genauer erfassen. So weisen z.B. die elongierten Spermatiden und Spermien bei der Methode nach Padykula und Herman(1955,a,b.) nur eine schwache bis mässige Enzymaktivität auf, welche vor allem in den Mittelstücken und Schwänzen der Spermien lokalisiert ist. Bei der Methode nach Meijer (197o) ist jedoch eine mäßige bis starke Enzymaktivität in den Mittelstücken und Schwänzen der Spermien nachweisbar. Auch bei den anderen Ergebnisse -(Lamina propria, Leydig- und Bindegewebszellen, interstitielle Blutgefäße)- ist die Aktivität der Enzyme nach der Methode von Meijer (197o) besser erfaßt. Dieses zeigt sich besonders bei der Auswertung der Stadienabhängigkeit der Enzymaktivität. Vergleicht man die Abb.3 (Methode nach Padykula und Herman, 1955, a,b.) mit der Abb.5 (Methode nach Meijer, 197o), so stellt man fest, daß die Spermatiden im Stadium VII der Spermatogenese nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b.) eine mäßige und nach der Methode von Meijer (197o) eine sehr starke Enzymaktivität zeigen, dies gilt auch für die anderen Spermatogenesestadien. Beim Vergleich der beiden Methoden fällt auf, daß Padykula und Herman (1955, a,b.) bei einem pH von 9,4 arbeiten. Dieser entspricht aber nicht dem optimalen menschlichen bzw. tierischen Gewebs-pH-Wert. Meijer (197o) dagegen arbeitet mit einem pH-Optimum von 7,2; das kommt dem menschlichen bzw. tierischen pH-Optimum ziemlich nahe. Weiterhin fällt auf, daß die alkalischen Phosphatasen bei der Methode nach Padykula und Herman (1955, a,b.) mit Cystein oder BAL gehemmt werden müssen, während sie nach der Methode nach Meijer (197o) wegen des pH-Optimums nicht in Betracht gezogen werden müssen. Dies könnte u.a. eine der Ursachen für die bessere und genauere Intensität und Lokalisation der Enzymaktivität bei der Methode nach Meijer (197o) sein. Weiterhin erwähnt Meijer (197o),

daß die alkalischen Phosphatasenhemmer (z.B. BAL, Cystein) auf die Intensität der ATPasen-Enzymaktivität nach seiner Methode keinen Einfluß haben. Seine Untersuchung über die Ca^{++}-ATPase in Herz- und Skelettmuskelpräparaten führten zur Feststellung, daß die Ca^{++}-ATPase nach der Methode Padykula und Herman (1955, a,b.) im intermyofibrillären Raum erscheint, wo eigentlich kein Myosin vorhanden ist. Zusätzlich treten Präcipitate auf, die morphologisch nicht mit der histochemischen Lokalisation in Zusammenhang gebracht werden können. Diese Nachteile konnten mit der Meijerschen Methode behoben werden.

Die Ca^{++}-ATPase ist hauptsächlich in den kontraktilen Elementen einzelner Zellen lokalisiert, daher wird diese ATPase auch Myosin-ATPase genannt. Die Verteilung und Intensität dieses Enzymes liefert Hinweise über Kontraktilitätsprozesse. Die Lamina propria des Rattentestis zeigt eine nach der Methode von Meijer (197o) starke bis sehr starke, nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b.) aber nur mäßige Aktivität. Die Lamina propria besteht aus vier bis fünf Zellschichten. (Kormano und Howatta, 1972; Söderström, 1981). Diese Zellschichten enthalten neben kollagenen Fasern im interzellulären Bereich Fibroblasten und spezialisierte Fibrocyten, die sogenannten Myoidzellen. (Böck et al., 1972; Kormano und Hovatta, 1972; Breitenecker et al., 1974; Hilscher et al. 1979). Die Kontraktilität der Lamina propria ist wichtig für die folgenden physiologischen Prozesse:

1. Aufrechterhaltung der Blut-Hodenschranke
2. Stofftransport vom Interstitium in die Tubuli seminiferi
3. Freisetzung der Spermien.

(Dym and Fawcett, 197o; Setchell and Waites, 1975; Waites and Gladwell, 1982).

Die schwache Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Cytoplasma der Sertolizellen des Rattenhodens deutet auf eine Kontraktilitätsbereitschaft besonders während der Ernährung der Spermien hin. Sie tritt dann auf, wenn die Spermienköpfe im Cytoplasma der Sertolizellen eingetaucht sind. Wie Lojda et al.(1979) beschreiben, kann mit der Methode nach Padykula und Herman (1955, a,b.) hauptsächlich die Myosin-ATPase, aber auch im geringen Umfang die Mitochondrial- und Membran-ATPase erfaßt werden. Die elongierten Spermatiden und Spermien im luminalen Compartment zeigen nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b.) eine schwache bis mäßige, nach der Methode von Meijer (197o) eine mäßige bis starke Aktivität. Dies deutet danach möglicherweise auch auf energieabhängige Vorgänge in den beiden genannten Geschlechtszellen hin.

4.2 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Rattenhoden

Bis heute sind in der Literatur weder im Testisgewebe des Menschen noch im Hodengewebe einer Tierart Angaben über den histochemischen Nachweis der Mg^{++}-ATPase bekannt. Das Verhalten der Mg^{++}-ATPase in den Geschlechtszellen, besonders in den Spermien und Spermatiden zeigt eine deutliche Korrelation mit den verschiedenen Stadien der Spermatogenese. Hier fällt besonders auf, daß die ausgereiften Spermien im Stadium VII der Spermatogenese eine maximale Aktivität aufweisen. Während die Ca^{++}-ATPase in den Spermien nur während der späten Reifungsphase (Stadium V bis VIII der Spermatogenese) deutlich sichtbar war, läßt sich die Mg^{++}-ATPase bei allen vierzehn Stadien der Spermatogenese deutlich nachweisen. In der vorliegenden Studie zeigen die elongierten Spermatiden und Spermien eine mäßige bis sehr starke Enzymaktivität, die Sertolizellen, in deren apikalen Bereich die Köpfe der Spermien eingetaucht sind, weisen im Cytoplasma eine

mäßige Aktivität auf. In der Lamina propria tritt eine diffuse starke bis sehr starke Aktivität auf, ebenso wird in den Leydig- und Bindegewebszellen eine mäßig bis starke Aktivität festgestellt. In der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße ist die Anfärbung sehr stark. Abhängig von den Stadien der Spermatogenese scheinen die Spermien in der Lage zu sein, energiereiche Substanzen zu speichern, welche sie dann für die Motilität dringend benötigen. Dies beweisen auch die ausgedehnten morphologischen und biochemischen Studien von Keyhani und Storey (1973), welche in in-vitro Versuchen aufzeigten, daß die Mitochondrien in den Spermatozoen des Kaninchenhodens in der Lage sind, "energy conservation" durchzuführen (S. 557). Sie folgerten daraus daß diese "energy conservation" eine essentielle Bedeutung für die Spermienmotilität haben müsse. Die Mg^{++}-ATPase, deren Vorkommen von uns im Hodengewebe beobachtet wurde, ist nach heutiger Ansicht in den Mitochondrien einzelner Zelltypen bzw. Gewebstypen lokalisiert. Die Spermatozoen sind wie allgemein bekannt, mitochondrienreich. Die maximale Aktivität der Mg^{++}-ATPase, die in den Stadien VII bis VIII der Spermatogenese festgestellt wurde, steht im Einklang mit oben genannter Interpretation, d.h. daß die Spermien kurz vor der Freisetzung mit einer maximalen Konzentration von energiereichen Substanzen ausgerüstet sind, die sie für ihre Motilität dringend benötigen. Die Spermienmotilität ist für eine Befruchtung von essentieller Bedeutung (Keyhani und Storey, 1973; Krause und Peters, 1980).

4.3 Aktivität der Ca^{++}-ATPase im Froschhoden.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, befanden sich die Froschhoden im Übergang von der Reifungsphase zur Ruhephase der Fortpflanzung.

Brökelmann (1964) untersuchte elektronenmikroskopisch Hoden, Hypophysen sowie Daumenschwielen von Fröschen (Rana temporaria) während eines spermatogenetischen Zyklus. Er fand u.a., daß in der Zeit der aktiven Spermatogenese (Mai bis August) die Leydigschen Zwischenzellen das Bild inaktiver Zellen bieten; im Herbst dagegen (Ruhephase) erwachen diese Zwischenzellen wieder zu neuer Aktivität, die dann bis zur Brunst dauert. Bekannt ist weiterhin, daß die Sertolizellen bei allen Vertebraten in ihrer ernährenden, stützenden und kontraktilen Funktion für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielen (Lofts, 1974). Mit Hilfe der Enzymhistochemie wurden bei Rana temporaria die Funktionen der einzelnen Strukturen im Hodengewebe, besonders in Sertoli- und Leydigzellen untersucht (van Oordt und Brands, 197o; Lofts, 1974). Auch Jülich et al.(1982), die die jahreszeitliche Veränderung der Ca^{++}-ATPase nach der Methode Padykula und Herman (1955, a,b.) in Rana temporaria beschrieben, fanden während der gesamten Ruhephase sowohl in den Sertolizellen als auch in den Spermienbündeln und in der Lamina propria entsprechende Enzymaktivität. Die Aktivität der Sertolizellen wurde verstreut im Cytoplasma - dabei gehäuft in der Peripherie der Zelle - festgestellt, in den Spermienbündeln war sie hauptsächlich in den Schwänzen konzentriert; die Intensität dort war sehr stark. In der Lamina propria zeigte sich eine mäßig starke Aktivität. Weiter fanden die Autoren heraus, daß im Monat Juli, wenn die Entwicklung der Keimzellen bis zum Stadium der Spermatocyten fortgeschritten ist, eine kurzfristige Abschwächung der Enzymaktivität sowohl in den Strukturen der Germinalzysten als auch in der Lamina propria beobachtet werden konnte.
In der vorliegenden Studie finden sich nach der Methode von Padykula und Herman(1955, a,b.) und nach der Methode von Meijer (197o) im wesentlichen übereinstimmende Befunde

mit Jülich et al. (1982). Während letztere in den Spermienschwänzen eine mäßige Aktivität feststellten, finden wir dort nur eine schwache Aktivität. Dies scheint durch das Stadium der Ruhephase bestimmt zu sein. Die Sertolizellen zeigen im Cytoplasma eine mäßige Aktivität. In der Lamina propria sowie in den Leydig- und Bindegewebszellen tritt eine mäßige Enzymaktivität auf. Zusätzlich wird in der Tunica intima und media der interstitiellen Blutgefäße eine mäßige Anfärbung festgestellt. Mit der Methode nach Meijer (197o) zeigt sich hier allerdings eine starke Enzymaktivität. Beim Vergleich der beiden Methoden sind hier keine deutlichen Aktivitätsunterschiede nachweisbar. Lediglich in den Wänden der interstiellen Blutgefäße tritt bei der Methode nach Meijer (197o) eine stärkere Enzymaktivität auf.

Wenn die neugebildeten Sertolizellen im August Anschluß an die Tubuluswand suchen, weisen sie eine deutliche ATPase-Reaktion auf. Der Wechsel in ein neues Milieu führt zu einem starken Zellstoffwechsel, der sich in der Lokalisation der ATPase-Aktivität zeigt. Die Aktivität verstärkt sich mit Beginn der Ruhephase, sobald die ausgereiften Sertolizellen eine stützende und kontraktile Funktion für die Spermienbündel übernommen haben. Diese Aktivitätszunahme scheint mit der Zunahme des Stoffwechselaustausches über die Zellgrenzen hinweg begründet. Nach Lofts(1974) ist die Kontraktilität der Sertolizelle für die Ernährung und anschließende Freisetzung der Spermien von großer Bedeutung. Auch die Schwanzfilamente der neu entstandenen Spermien zeigen bereits eine schwache ATPase-Aktivität. Die Ca^{++}-ATPase-Aktivität in der Lamina propria unterliegt zeit- und intensitätsmäßig denselben Schwankungen wie die in den Follikelzellen bzw. Sertolizellen.

4.4 Aktivität der Mg^{++}-ATPase im Froschhoden.

Eine maximale Enzymaktivität weisen die Spermien auf.

(Aktivitätsgrad: sehr stark). Die Aktivität ist in den Spermienschwänzen lokalisiert. Die Sertolizellen zeigen nur eine schwache bis mäßige Aktivität, in der Lamina propria wird eine mäßig starke Aktivität festgestellt. Die Leydig- und Bindegewebszellen enthalten ebenfalls eine mäßige Aktivität, während in den Wänden der interstitiellen Blutgefäße nur eine schwache Anfärbung festgestellt wird. Die Fortbewegung bei der der Ruhephase folgenden Spermiation der Rana temporaria stellt für die Spermien einen energieaufwendigen Prozeß dar. Es darf angenommen werden, daß hierfür ATP durch mitochondriale ATPase bereitgestellt wird. Krause und Peters (1980) berichteten, daß ATP bei höheren Vertebraten ein wichtiges Verbindungsglied in der Beziehung zwischen Stoffwechsel und Motilität von Spermien bildet. Diese Aussage stimmt mit unseren Beobachtungen der Mg^{++}-ATPase überein, da sich in den Spermienschwänzen die höchste Aktivitätsstufe der mitochondrialen ATPase befindet.

4.5 Vergleich der ATPasen-Aktivität zwischen Ratten- und Froschhoden.

Ratte und Frosch gehören zu zwei verschiedenen Klassen des Tierreiches. Durch diese Zugehörigkeit ergeben sich Unterschiede im Aufbau des Testis und im Ablauf der Spermatogenese. Während bei der Ratte ein Spermatogenesezyklus beschrieben wurde, der aus vierzehn Stadien besteht und über einen kontinuierlichen Regenerationsmechanismus verfügt (Leblond und Clermont, 1952, a,b.), gibt es beim Frosch Rana temporaria einen Fortpflanzungszyklus, der eine deutliche jahreszeitliche Abhängigkeit zeigt [1] (Witschi, 1924; van Oordt, 1956; Brökelmann, 1964; Jülich et al. 1982).

Es fällt auf, daß sowohl bei der Ratte als auch beim Frosch die Ca^{++}-ATPase hauptsächlich in der Lamina

---

[1] s.nächste Seite

propria und in den interstitiellen Blutgefäßen lokalisiert ist. Wie bereits vorher erwähnt (S. 32), spielt die Lamina propria bei der Ratte zur Aufrechterhaltung der Sertolizellfunktionen, der Blut-Hodenschranke und für die Spermienfreisetzung eine wichtige Rolle. Jülich et al. (1982) berichteten ausführlich über die jahreszeitlichen Veränderungen im Verhalten der Ca^{++}-ATPase beim Frosch Rana temporaria und diskutierten die Kontraktilität der Lamina propria, die für die Sertolizellfunktionen und für die Freisetzung der Spermien im Monat März von essentieller Bedeutung ist.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß die enzymhistochemische Methode von Meijer (197o) zur Darstellung der Ca^{++}-ATPase sowohl für den Rattentestis als auch für den Froschtestis der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b.) überlegen ist.

Die Mg^{++}- mitochondriale ATPase zeigt bei beiden Tierarten eine maximale Enzymaktivität in den Spermienschwänzen. Diese ist außerdem auch in der Lamina propria und in den interstitiellen Blutgefäßen lokalisiert. Während die Intensität der Enzymaktivität in den Spermienschwänzen und in der Lamina propria im Hoden der Ratte und des Frosches gleich sind, läßt sich in den interstitiellen Blutgefäßen bei Ratte und Frosch ein deutlicher Unterschied erkennen. Hier tritt bei der Ratte

---

[1] Jülich (1982) führt hierzu aus:
Bei Amphibien wird zwischen einem diskontinuierlichen, einem potentiell kontinuierlichen und einem kontinuierlichen spermatogenetischen Zyklus unterschieden: Beim kontinuierlichen Zyklus, der bei den subtropischen Anuren Rana erytrea und Rana grahami nachgewiesen wurde, läuft eine ständige, temperaturunabhängige Spermatogenese ab; beim potentiell kontinuierlichen Zyklus, der bei den europäischen Anuren Rana esculenta und Rana graeca festgestellt werden konnte, ist sowohl die aktive spermatogenetische als auch die Ruhe-Phase temperaturabhängig, während beim diskontinuierlichen Zyklus der europäischen Rana temporaria, Rana arvalis und Rana dalmatine lediglich die Phase der aktiven Spermatogenese von der Temperatur abhängt und die Ruhephase absolut temperaturrefraktär ist.

die Enzymaktivität sehr stark auf, während sie beim Frosch nur schwach nachweisbar ist. Dies deutet auf eine unterschiedliche Wandpermeabilität der Blutgefäße in den Testes beider Tierarten hin. Die Anuren, die eine poikilothermische Regulation aufweisen, haben bekanntlich eine geringe Blutversorgung der Testes (Lofts, 1974). Die starke Enzymaktivität in den Spermienschwänzen weist darauf hin, daß die Mg^{++}-ATPase-Aktivität sowohl beim Testis der Ratte als auch beim Testis des Frosches für die Spermienmotilität ein wichtiges Enzym darstellt. Die weitgehend ähnlichen Verteilungsmuster und Intensitätsgrade der Ca^{++}-ATPase und der Mg^{++}-ATPase im Testis der Ratte und des Frosches deuten darauf hin, daß die molekulare Evolution dieser Enzyme schon bei den Anuren abgeschlossen zu sein scheint.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Ca^{++}-aktivierte-Myosin-ATPase und die Mg^{++}-aktivierte mitochondriale-ATPase im Testis der Ratte und des Frosches Rana temporaria enzymhistochemisch darzustellen. Die Ca^{++}-ATPase bei beiden Tierarten wurde mit der Methode Padykula und Herman (1955, a,b.) sowie der Methode nach Meijer (197o), die Mg^{++}-ATPase nach der Methode von Meijer und Vloedman (198o) dargestellt.

Beim Rattentestis fand sich nach der Methode von Padykula und Herman (1955,a,b.) die stärkste Enzymaktivität der Ca^{++}-ATPase in der Lamina propria, sowie in den interstitiellen Blutgefäßen; außerdem eine mäßige Aktivität in den Spermien während des Stadiums VII der Spermatogenese. Bei der Methode nach Meijer (197o) wurde die stärkste Enzymaktivität - stadienabhängig - in den Spermien, in der Lamina propria und in den interstitiellen Blutgefäßen festgestellt. Die Mg^{++}-ATPase in den Spermatiden und Spermien konnte mit allen Stadien der Spermatogenese korreliert werden. Außerdem fand sich eine starke Aktivität in der Lamina propria und in den interstitiellen Blutgefäßen

Die sich im Übergang von Reifungs- zur Ruhephase befindlichen Froschtestes zeigten sowohl nach der Methode von Padykula und Herman (1955, a,b.) als auch nach der Methode von Meijer (197o) eine schwache Aktivität in den Spermienschwänzen, eine mäßige Aktivität in der Lamina propria und eine mäßigebis starke Aktivität in den interstitiellen Blutgefäßen. Die größte Aktivität der Mg^{++}-ATPase fand sich im Froschtestis in den Spermienschwänzen. In der Lamina propria zeigte sich eine mäßig bis starke Aktivität. In den Leydig- und Bindegewebszellen wurde eine mäßige, in den interstitiellen Blutgefäßen eine schwache Aktivität festgestellt.

Die vorliegenden Befunde ergaben, daß die Methode von Meijer (197o) der Methode von Padykula und Herman (1955,a,b.) für die Ca^{++}-ATPase überlegen ist. Nach der Methode von Meijer (197o) konnten die Lokalisation und die Intensitätsgrade der Enzymaktivität genauer und besser dargestellt werden.

Die Ca^{++}-aktivierte Myosin-ATPase kommt in den kontraktilen Filamenten der Testes vor. Die funktionelle Bedeutung dieses Enzymes in der Lamina propria, nämlich die Aufrechterhaltung der Blut-Hodenschranke und die Spermienfreisetzung wird diskutiert. Die Mg^{++}-aktivierte mitochondriale-ATPase ist für die Bildung von energiereichen Substanzen in den Spermien von essentieller Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird die wichtige Rolle, die dieses Enzym für die Spermienmotilität spielt, besprochen.

6. Literaturverzeichnis

Baust, P., Goslar, H.G. und Tonutti E.: Das Verhalten einiger Phosphatasen im Hoden von Ratte, Maus und Meerschweinchen nach Östrogenbehandlung. Acta histochem. 26, 343 - 35o (1967).

Bloom, W. und Fawcett, W.: A textbook of histology. 8o5 - 857, Saunders, Philadelphia (1975).

Böck, P., Breitenecker, G. und Lunglmayr, G.: Kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) in der Lamina propria der Hodenkanälchen vom Menschen. Z. Zellforsch. 133, 519 - 527 (1972).

Breitenecker, G., Böck, P. and Lunglmayr, G.: Histochemical localization of phosphohydrolases in testes of man and rat. Z. Anat. Entwickl. Gesch. 143, 3o1 - 313 (1974).

Brökelmann, J.: Über die Stütz- und Zwischenzellen des Froschhodens während des spermatogenetischen Zyklus. Z. Zellforsch. 64, 429 - 461 (1964).

Bucher, O.: Cytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 472 - 489, Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern (1973).

Dym, M. and Fawcett, D.W.: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartment of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 3, 3o8 - 326 (197o).

Ernst, S.A.: Transport Adenosine Triphosphatase Cytochemistry II. Cytochemical Localization of Oubain-sensitive, potassium dependent Phosphatase activity in the secretory epithelium of the avian Salt gland. J. Histochem. Cytochem. 2o, 23 - 38 (1972).

Firth, J.A.: Cytochemical approaches to the localization of specific adenosine triphosphatases. Histochem. J. 1o, 253 - 269 (1978).

Freiman, D.G. and Kaplan, N.: Studies on the histochemical differentiation of enzymes hydrolyzing adenosine triphosphate. J. Histochem. Cytochem. 8, 159 - 17o (196o).

Hilscher, B., Passia, D. and Hilscher W.: Kinetics of the Enzymatic Pattern in the Testis. I. Stage Dependence of Enzymatic Activity and its Relation to Cellular Interactions in the Testis of the Wistar Rat. andrologia 11, 169 - 181 (1979).

Jülich, G., Haider, S.G., Passia, D. und Goslar, H.G.: Jahreszeitliche Veränderungen der Adenosintriphosphatase-Aktivität in den Germinalcysten des Testis vom Grasfrosch Rana temporaria. Acta histochem. 71, 191 - 2oo (1982).

Jülich, G.: Histologische und enzymhistochemische Untersuchungen des jahreszeitlichen Stützzellen-Zyklus im Testis des Grasfrosches Rana temporaria. Dissertation Universität Düsseldorf, 1 - 76 (1982).

Keyhani, E. and Storey, B.T.: Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. Biochem. Biophys. Acta 3o5, 557 - 569 (1973).

Kormano, M. and Hovatta, O.: Contractility and Histochemistry of the Myoid Cell Layer of the Rat Seminiferous Tubules during Postnatal Development. Z. Anat. Entwickl. Gesch. 137, 239 -248 (1972).

Krause, W. und Peters, S.: Zur ATP-Bestimmung im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren. Z. Zuchthygiene 2, 71 (198o).

Leblond, C.P. and Clermont, Y.: Spermiogenesis in rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid fuchsin sulfurous acid technique. Am. J. Anat. 9o, 167 - 215 (1952, a).

Leblond, C.P. and Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of seminiferous epithelium in the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 548 - 573 (1952, b).

Lofts, B.: Physiology of Amphibia. Vol. 2, 1o7 - 218 Academic Press, New York (1974).

Lojda, Z., Gossrau, R. and Schiebler, T.H.: Enzyme Histochemistry, A Laboratory Manual, 93 - 1oo, Springer Verlag Berlin (1979).

Meijer, A.E.F.H.: Histochemical Method for the Demonstration of Myosin adenosine Triphosphatase in Muscle Tissues. Histochemie 22, 51 - 58 (197o).

Meijer, A.E.F.H. and Vloedman, A.H.T.: The Histochemical Characterization of the Coupling State of Skeletal Muscle Mitochondria. Histochem. 69, 217 - 232 (1980).

Murakami, M.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am interstitiellen Gewebe des Rattenhodens unter besonderer Berücksichtigung der Leydigschen Zwischenzellen. Z. Zellforsch. 72, 139 - 156 (1966).

Padykula, H. and Herman, E.: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. J. Histochem. Cytochem. 3,161 - 169 (1955, a).

Padykula, H. and Herman, E.: The Specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. J. Histochem. Cytochem. 3, 176 - 195 (1955, b).

Passia, D., Hilscher, B., Hilscher, W. und Goslar, H.G.: Das Verhalten einiger Hydrolasen und Oxidoreduktasen während der verschiedenen Abschnitte der Spermatogenese der Ratte. Verh. Anat. Ges. 72, 533 - 535 (1978).

Pearse, A.G.E.: Histochemistry, Theoretical and Applied Vol. 1, 524 - 526, Churchill Livingstone, Edinburgh (1968).

Schneider, M.: Physiologie des Menschen, 37o - 376, Springer Verlag Berlin (1971).

Setchell, P.P. and Waites, G.M.H.: The blood Testis barrier. Handbook of Physiology, Section 2: Endocrinology, 143 - 172, Williams and Wilkins, Co. Baltimore (1975).

Söderström, K.O.: Scanning Electron Microscopy of Mechanically Isolated Seminiferous Tubules of the Rat Testis. andrologia 13 (2), 155 - 161 (1981).

van Oordt, P.G.W.J.: Regulation of the spermatogenetic cycle in the common frog (Rana temporaria)Dissertation, Univ. Utrecht, 1 - 111 (1956).

van Oordt, P.G.W.J. and Brands, F.: The Sertoli cells in the testis of the common frog Rana temporaria. J. Endocrinol. 48, I (197o) (Abstr.).

Wachstein, M. and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Amer. J. clin. Path. 27, 13 - 23 (1957).

Waites, G.M.H. and Gladwell, R.T.: Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood-testis barrier. Phys. Rev. 62 (2), 624 - 671 (1982).

Witschi, E.: Die Entwicklung der Keimzellen der Rana temporaria. Z. Zellforsch. 1, 523 - 561 (1924).

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. med. H.G. Goslar bin ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie für die freundliche Anleitung verbunden.

Herrn Dr. S.G. Haider möchte ich sehr für seine wissenschaftliche und methodische Betreuung danken.

Frau Baasen, Frau Berthold und besonders Herrn Faßbender danke ich für wertvolle technische Hinweise.

LEBENSLAUF

Richard Bartels, geb. 12.03.1948 in Paderborn

Eltern: Richard Bartels, techn.Kaufmann, und
Isa Bartels, geb. Mauler

Schulbildung:

1954 - 1959:	Volksschule in Düsseldorf
1959 - 1965:	Gymnasium Königstein/Taunus (Internat)
1965 - 1970:	Gymnasium Düsseldorf
15.10.1970:	Abitur

Studium:

WS 70/71	Immatrikulation Universität (Fach Physik)
SS 71:	Wechsel zum Fach Humanmedizin
30.11.79:	Staatsexamen Medizin Universität Düsseldorf

Dez. 79 - Dez. 80:	Medizinalassistent St.Lukas-Klinik Solingen (Internistische und Chirurgische Abteilung)
Dez. 80 - Dez. 81:	Assistenzarzt i.d. Chirurgischen Abteilung der St.Lukas-Klinik, Solingen
Ab 01.01.82:	Assistenzarzt in der HNO-Abteilung Städt. Krankenhaus Solingen

---

30.04.75:	Eheschließung mit Frau Uta Bartels, geb. Merholz, Zahnärztin 2 Töchter, 8 und 4 Jahre alt

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606